

“Caracterización Fitoquímica y Antimicrobiana del Llantén en Corrientes-Argentina”

Tesis Doctoral

Ramírez Lelia Inés

2022

CARRERA

DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
NORDESTE EN ODONTOLOGÍA

Tercera cohorte

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA
Y ANTIMICROBIANA DEL LLANTÉN EN
CORRIENTES-ARGENTINA.

Campo de Aplicación Probable: Odontología.

Doctorando: Od. Esp. Lelia Inés Ramírez

Director de Tesis: Dra. Adriana Martínez

Co-Director de Tesis: Dra. Viviana E. Karaben

Res: 510/15 C.D.

Res: 066/18 C.D.

Año: 2022

Dedicado con amor a mamá, a mi abuela, a Ana.

Agradezco infinitamente a cada persona que fue parte de la realización de este trabajo, sin ellos no habría podido llegar hasta donde llegué. Simplemente GRACIAS.

Con cariño y amor

Lelía Inés Ramírez

ÍNDICE

✚	Resumen.....	1
✚	Introducción.....	2
	Fitoterapia en la historia de la medicina.....	3
	Planteamiento del problema.....	6
	Justificación.....	7
✚	Marco Teórico.....	9
	Capítulo 1: <i>Plantago major</i>	10
	Clasificación Taxonómica.....	11
	Plantaginaceae.....	11
	Capítulo 2: Caracterización Fitoquímica.....	16
	Preparación de extractos.....	17
	Identificación y separación de metabolitos.....	20
	Capítulo 3: Actividad antimicrobiana.....	21
	Bacterias que forman parte de infecciones odontógenas.....	21
✚	Estado del Arte.....	23
✚	Objetivos.....	28
✚	Hipótesis.....	28
✚	Diseño Metodológico.....	29
	Colección de las muestras vegetales.....	30
	Preparación de las muestras.....	32
	Obtención de los extractos por maceración.....	32
	Tamizaje fitoquímico y cromatografía.....	34
	Marcha fitoquímica.....	34
	Ensayo microbiológico.....	42
	Obtención de cultivos.....	42
✚	Resultados.....	48
✚	Discusión.....	59
✚	Conclusiones.....	65
✚	Referencias Bibliográficas.....	67
✚	Anexos.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

✚ Tabla 1: Preparación de extractos.....	49
✚ Tabla 2: Resultado estudio fitoquímico.....	50
✚ Tabla 3. Comparación de los halos de inhibición en mm sobre <i>peptoestreptococo spp</i> entre las concentraciones del llanté.....	52
✚ Tabla 4. Comparación de los halos de inhibición en mm sobre <i>Actinomyces spp.</i> entre las concentraciones del llantén.....	53
✚ Tabla 5. Análisis de Varianza de los extractos sobre <i>Peptostreptococcus</i>	54
✚ Tabla 6: Para identificar que grupos son diferentes se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey.	55
✚ Tabla 7. Análisis de Varianza de los extractos sobre <i>Actinomyces spp.</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

✚ Figura 1. <i>P. tomentosa</i> Lam.....	10
✚ Figura 2. Rotaevaporador.....	19
✚ Figura 3. Obtención <i>P. tomentosa</i> Lam.....	31
✚ Figura 4. Almacenamiento <i>P. tomentosa</i> Lam.....	31
✚ Figura 5. Maceración.....	33
✚ Figura 6. Filtración.....	34
✚ Figura 7. Marcha fitoquímica.....	35
✚ Figura 8. Identificación de Esteroides.....	36
✚ Figura 9. Identificación de saponinas.....	38
✚ Figura 10. Identificación de Taninos.....	39
✚ Figura 11. Identificación de Aminoácidos.....	40
✚ Figura 12. Identificación de Glucósidos – Azúcares.....	41
✚ Figura 13. Identificación de Iridoides.....	41
✚ Figura 14. Aislamiento primario.....	42
✚ Figura 15. Jarra anaerobiosis.....	43

✚ Figura 16. Cepas de <i>Peptostreptococcus</i> spp y <i>Actinomyces</i> spp.	44
✚ Figura 17. Secuencia preparación Mc Farland.....	45
✚ Figura 18. Dilución de los extractos.....	46
✚ Figura 19. Preparación para incubar en estufa.....	47
✚ Figura 20. Inhibición del extracto.....	56
✚ Figura 21. Caja de Petri con extractos.....	57
✚ Figura 22. Control negativo.....	57

RESUMEN

El llantén es una planta de fácil localización en Corrientes –Argentina, de factible obtención al ser una maleza. El objetivo del trabajo fue realizar la caracterización fitoquímica y el estudio de sensibilidad *in vitro* de *Peptoestreptococcus spp* y *Actinomyces spp* frente al extracto de *Plantago tomentosa* Lam y determinar si presenta actividad antimicrobiana.

Para facilitar su estudio se dividió a la planta en sus diferentes partes, se extrajeron los extractos de las partes aéreas en ambos períodos estacionarios, los que presentaron la misma composición química (taninos, azúcares, aminoácidos, esteroides o triterpenos y en menor medida alcaloides, fenoles y saponinas). Los extractos correspondientes a las raíces mostraron alta presencia de azúcares en el período estacionario de invierno, así como la presencia de taninos, aminoácidos, saponinas y esteroides o triterpenos. Respecto a la presencia de iridoides, responsable de la actividad antibacteriana, se detectaron dos manchas color verde rojizo a Rf 0,3 y 0,8 respectivamente compatibles con dichos compuestos en los extractos alcohólicos de raíces en ambas estaciones.

Se realizó una prueba de sensibilidad semicuantitativa para evaluar la sensibilidad *in vitro*, de la cepa *Peptoestreptococcus spp* y *Actinomyces spp* frente a extractos de *P. tomentosa* Lam. Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el Método de Kirby-Bauer por difusión en agar, para lo que se utilizó el medio de Mueller-Hinton. Se impregnaron discos de papel absorbente de calidad superior, de 6 mm de diámetro, cada uno con 20 µl de la solución de 2,5% (p/v) y de 100% de los extractos. Como control negativo se utilizó solución fisiológica estéril, como control positivo 20 µl de Plac Out®, y 20 µl de propilenglicol para comprobar la actividad antimicrobiana del vehículo. Se realizó la siembra con la cepa en estudio en medio Mueller-Hinton, se colocaron los discos impregnados en las distintas diluciones del extracto y se incubó en estufa de cultivo a 37°C durante 24 hs. Se observó un halo de inhibición en las cepas de *Peptoestreptococcus spp* con la concentración del 100 %. La misma prueba se realizó con *Actinomyces spp*, obteniendo resultados negativos. Con respecto a *Actinomyces spp*. no se observó halo de inhibición en ninguno de los extractos probados en sus diferentes concentraciones y tampoco el control negativo ni el propilenglicol. El control positivo de Plac Out ® generó halos inhibitorios en todos los casos. Se concluye que el *P. tomentosa* Lam., presentó inhibición antimicrobiana frente a *Peptoestrepccoccus spp*, según los resultados obtenidos, no así frente a las cepas de *Actinomyces spp*

Palabras Clave: Bacterias odontógenas – *Plantago* - Iridoides



INTRODUCCIÓN



Fitoterapia en la historia de la medicina

La Fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus distintas normativas y directrices sobre el uso de las plantas en la medicina, no ha definido el término de fitoterapia, solo se refiere, al de medicina herbaria o herbolaria, y lo mismo sucede con el termino fitoterápico o fitofármaco, en relación a este, la OMS, se refiere, a medicamento herbario¹.

La Biodiversidad engloba a los seres vivos que habitan la tierra, siendo el resultado de miles de millones de años de evolución biológica. Se estima que existen alrededor de 400 mil especies de plantas en el planeta, y probablemente el 20% posee un potencial medicinal importante para la salud ².

La historia del uso de plantas medicinales ha demostrado que forman parte de la evolución humana y fueron los primeros recursos terapéuticos utilizados por los pueblos. Las civilizaciones antiguas en sus experiencias con hierbas, tuvieron éxitos y fracasos, siendo que, muchas veces, éstas curaban y en otras producían efectos adversos severos, incluso muerte ^{3,4}.

La medicina tradicional ha sido difundida por el mundo y reconocida por la OMS en mayo de 1978, en la XXXI Asamblea General, donde a través de una resolución determinó el inicio de un programa mundial, apuntado al uso y la validación de los métodos de la llamada medicina tradicional ^{3,5,6}. La estrategia de la OMS sobre medicina tradicional promulga la utilización segura y eficaz a través de la

reglamentación y la investigación de hierbas naturales. Propone mejorar su disponibilidad y asequibilidad, el uso terapéutico racional entre los profesionales y los usuarios, y menciona incorporarlos dentro de los productos y prácticas en los sistemas de salud ^{2,5}.

En Nairobi (Kenia) en 1985 se realizó una conferencia de expertos con el fin de estudiar los medios y métodos que optimicen el uso racional de los medicamentos (URM) ⁷. La promoción del URM tiene como finalidad que los pacientes reciban las medicaciones apropiadas a sus necesidades clínicas, con una dosificación que satisfaga sus requerimientos individuales, por un período adecuado de tiempo y al costo más bajo para ellos y para su comunidad ⁷. En consecuencia, realizar una prescripción no debe entenderse como una acción automatizada. Una prescripción es un proceso lógico-deductivo mediante el cual el prescriptor, a partir del conocimiento adquirido, escucha el relato de síntomas del paciente, realiza un examen físico en busca de signos, además de exámenes complementarios, y concluye en una orientación diagnóstica y la decisión terapéutica ^{7,8}. Se debe reconocer que la subutilización de prescripciones priva al paciente de los beneficios terapéuticos pero la sobreutilización aumenta el riesgo de reacciones adversas ⁹. Es por ello que, a pesar de los avances alcanzados en la formulación de nuevos medicamentos, hoy existe la necesidad de encontrar alternativas naturales que nos brinden efectividad y seguridad en el tratamiento sin generar reacciones adversas ¹⁰.

La OMS acredita en la actualidad, la utilización de plantas medicinales, por ser considerada una buena opción farmacológica, más allá de la acción terapéutica de diversas plantas medicinales utilizadas popularmente, la fitoterapia representa una

parte importante de la cultura de un pueblo, siendo también parte de un saber utilizado y difundido por las poblaciones a lo largo de las generaciones ^{3,11}.

Argentina es un país con una importante diversidad biológica, en donde su gran variedad de climas permite obtener una flora muy bien diversificada y adaptada a cada ecosistema. El país cuenta con alrededor de 10 mil especies de plantas, una cifra que está en consonancia con casi la totalidad de la flora europea. Sin embargo, es poco lo que sabemos de ella, de ahí que resulte esencial investigarla y adaptarla a las necesidades de la ciencia, ya que resulta parte de nuestro patrimonio económico, social y cultural ^{2,12,13}.

No cabe duda de que la biodiversidad argentina es y seguirá siendo una fuente importante de productos naturales de importancia farmacéutica para el hombre. No obstante, y al igual que en otras regiones del mundo, el estudio de esta flora hasta la fecha es muy escaso, llegando a superar apenas un 1% de la cantidad total de especies estimadas para el territorio argentino ^{2,12,13}.

Este largo aprendizaje etnobotánico se inició con las primeras poblaciones indígenas que llegaron a la región hace miles de años, y terminó su enriquecimiento con la llegada de la colonización europea, que introdujo nuevos conocimientos desde Europa entre los siglos XVI y XX. En la actualidad se considera que existen por lo menos 1.200 plantas que crecen en territorio argentino y que poseen algún tipo de utilidad medicinal ¹².

Planteamiento del problema

En el área de la odontología existe una gran dificultad a la hora de seleccionar tratamientos farmacológicos de manera localizada, debido a que los medicamentos que tenemos en nuestro alcance son en su mayoría de uso sistémico. Esto lleva a tener que recurrir a investigaciones en el área de los fitofármacos, para así ahondar en los medicamentos herbarios y poder utilizarlos si generaran buenos efectos, como una nueva terapia alternativa para nuestra profesión y facilitar el alcance a nuestra sociedad, si sus efectos fueran benéficos.

La utilización de las plantas en forma de fitofármacos, sigue encontrando gran resistencia en la medicina tradicional, pero es indiscutible que las plantas constituyen el elemento terapéutico por excelencia en la medicina natural, respaldado por numerosos trabajos que así lo demuestran ¹⁴⁻¹⁷.

Caracterizar y estudiar los posibles efectos farmacológicos de plantas medicinales, permitiría disponer de conocimientos científicos, que justifique el uso popular de determinadas especies autóctonas, sobre todo para pacientes que por cuestiones culturales o por dificultad de acceso a la medicina tradicional, debe optar por el uso de Fitoterapia ^{16,17}.

En Corrientes, y en el nordeste de Argentina, se utiliza comúnmente una planta denominada llantén, la cual no se cultiva, y se considera una maleza ya que es abundante y accesible; se clasifica en 79 especies diferentes. En Latinoamérica se ha estudiado y comprobado el potencial de sus propiedades antiinflamatorias,

antibacterianas, antioxidantes, astringentes, antihemorrágicas; también como cicatrizante de heridas, tanto internas como externas ^{15,18-20}.

Consideramos que comprobar los efectos terapéuticos bacterianos será de gran utilidad en odontología y permitirá el potencial uso en el tratamiento de infecciones generadas por bacterias representativas en la cavidad bucal *Peptostreptococcus spp.* Y *Actinomyces spp.*

Justificación

Actualmente las plantas naturales se han convertido en una fuente importante en la fabricación de medicamentos, con el fin de crear terapias complementarias dentro de las que se incluyen plantas y extractos ²¹.

A la fecha se desconocen las características particulares de las especies regionales y dado que no han sido investigadas con rigor científico, existe la necesidad de explorar los recursos naturales, con métodos especializados para su identificación y caracterización de las propiedades fitoquímicas.

Consideramos además de vital importancia comprobar los potenciales efectos terapéuticos, entre ellos el antibacteriano, descritos en diversos estudios alrededor del mundo relacionados con varias especies de *Plantago spp.*^{14,22-32}. Debido a que este género herbario se encuentra con facilidad en nuestro medio y de ser comprobada la actividad antibacteriana de las especies por estudiar, podría facilitar

los tratamientos de diversas enfermedades bucales provocadas por *Peptostreptococcus spp.* y *Actinomyces spp.*



MARCO TEÓRICO



CAPITULO

1

PLANTAGO MAJOR

El llantén es una hierba originaria de Europa y Asia. Una de las especies más conocidas es el *Plantago major* una herbácea perenne, de tallos subterráneos no ramificados. Popularmente es conocida como “llantén mayor”, “llantén común” o “llantén grande”³³⁻³⁷.



Figura 1: *P. tomentosa* Lam. (Especie identificada en el Instituto de Botánica del Nordeste - Corrientes)

Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Plantaginaceae
Género	Plantago
Especie	Plantago Major
Nombre Científico	Plantago Major L.
Nombre común	Llantén ^{3,6,34,36-40}

Plantaginaceae

Características

Porte: sufrútices o arbustos, herbáceas anuales o perennes, arbustos y lianas.

Hojas: simples sin estípulas, paralelinervadas o curvinervadas, generalmente arrosetadas, alternas, rara vez opuestas.

Flores: en Plantago son protóginas, actinomorfas o algo zigomorfas, dispuestas en la axila de cada bráctea, pequeñas, anemófilas, casi siempre perfectas, generalmente en espigas sobre escapos axilares, áfilos, rara vez flores solitarias.

Perianto: en Plantago con sépalos $4 \pm$ connatos en la base, imbricados. Corola gamopétala, membranosa, con 4 lóbulos imbricados.

Androceo: estambres 4, alternipétalos, los 4 fijos al tubo corolino por largos filamentos o solamente 2, anteras versátiles o patentes, introrsas. $\frac{3}{4}$

Gineceo: ovario súpero, bicarpelar, uni o bilocular, carpelos 1-pluriovulados, estilo corto o largo, continuando en un estigma largo, filiforme o bien bilobado. $\frac{3}{4}$

Frutos: pixídio, núcula monosperma, cápsula septicida, loculicida o menos común poricida $\frac{3}{4}$

Semillas: numerosas y pequeñas o grandes, a veces pocas con embrión pequeño, erecto o apenas curvo y endosperma abundante ⁴¹.

Biología floral

En el género *Plantago* (Llantén) sus especies son plantas anemófilas generalmente protóginas ⁴². En los demás géneros no anemófilos se presentan muchas modificaciones en la estructura floral, materializadas en la reducción del número de las piezas florales, por lo cual hay ejemplos con números inferiores al básico de 5 en sépalos, pétalos y estambres. Son generalmente entomófilas, aunque a veces son polinizadas por aves ⁴¹.

Distribución y hábitat

Familia cosmopolita, particularmente abundantes en las zonas templadas ^{42,43}.

Especies de la familia Plantaginaceae

Presenta 90 géneros con 1700 especies⁴². En Argentina viven 22 géneros y 103 especies, de las cuales 9 especies y 2 subespecies son endémicas⁴⁴.

Importancia

Varias especies pertenecientes al género *Plantago*, vulgarmente llamadas llantén, son utilizadas para extraer la zaragatona. De los cultivos se obtienen dos cosechas anuales con una producción de 3000 a 3600 kg por cada 4000 m². La semilla contiene una sustancia mucilaginosa insípida con efecto laxante suave y puede sustituir al agar y al aceite mineral en el tratamiento de el estreñimiento crónico. Una vez extraído, el mucílago sirve como cosmético y como apresto para tejidos⁴⁵.

Plantago lanceolata L. (llantén): planta adventicia que es usada en medicina popular. La decocción de la raíz con unas gotas de limón se utiliza para lavar lesiones bucales y de garganta provocadas por la difteria. También este mismo cocimiento como infusión para indigestión⁴⁶.

Plantago major L.: hierba introducida como maleza de origen Euroasiático y que tiene amplia distribución en nuestro país. Por ser una planta de fácil localización, no se cultiva, es una maleza que crece de manera silvestre. Popularmente se emplea por sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, astringentes,

antihemorrágicas; también como cicatrizante de heridas, tanto internas como externas ⁴⁷.

Principios Activos y sus Acciones Terapéuticas

En la medicina popular a las hojas se le atribuyen **propiedades antiinflamatorias**, debido a que contienen componentes como *plantamajosida*, *baicaleína*, *hispidulina*, *ácido ursólico* y *ácido oleanólico*. La cadena larga de alcoholes primarios presentes en la cera de las hojas ayuda a tratar heridas superficiales. Cuenta con diversos flavonoides, tales como *apigenina*, *luteolina* y *escutellarina* ^{3,34,39,40,48-51}.

Se utiliza para tratar el dolor de garganta y la irritación en la boca; además, para reducir la inflamación glandular ^{3,6,34,48,51}. Esto se debe a que la planta cuenta con un alto contenido en mucílagos con **propiedades emolientes**, que suavizan las mucosas respiratorias ^{3, 6}.

Las hojas frescas del llantén tienen **propiedades antisépticas** para favorecer la cicatrización y prevenir el riesgo de infecciones ^{3,6,39,52}.

La **propiedad cicatrizante** se atribuye tanto a su riqueza en *taninos*, como a su contenido en *alantoína* que estimula la regeneración de células epidérmicas, motivo por el cual este componente es de gran uso en la industria de la cosmética y forma parte de la composición de cremas para piel ^{3,6,39,49,51-56}.

Entre los múltiples usos populares de esta planta en el campo de la salud humana, se refiere sus **propiedades hemostáticas** ya que promueve la coagulación

de la sangre en las heridas, evitando hemorragias ^{3,6,39}. También sus propiedades **astringentes** adecuadas para detener la diarrea, disentería y amebiasis. Además, una infusión de hojas de *P. major*, inhibe en un 82 a 95% la acidez de la secreción gástrica, debido a que contiene metabolitos con propiedad antiinflamatoria, pudiendo ser éstos los flavonoides y esteroides, a los primeros se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, debido a la inhibición de la fosfolipasa A2, a la 5-lipoxigenasa, o a la COX, que influyen en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas ^{33,34,39,48,51}.

En lo que respecta al sistema respiratorio, tradicionalmente cuenta con distintas aplicaciones en la comunidad; para tratar enfermedades como la tos, faringitis, laringitis, bronquitis, tuberculosis, entre otras ^{3, 6,50,51}.

La *aucubigemina*, derivado de la aucubina, es el principio activo de mayor relevancia, responsable de la actividad antibacteriana. Por hidrólisis, se forma un dialdehído que actúa como bactericida, ya que desnaturaliza las proteínas de ciertos microorganismos. No obstante, si la planta es sometida al calor, la aucubigemina pierde su efecto terapéutico ^{33,39,51,57}.

P. major cuenta, también, con sustancias como: *ácido salicílico, sales de potasio y zinc, rutina, alcaloides (noscapina), esencias, resinas, esteroides, bases aminadas y compuestos azufrados*. Igualmente, posee ácidos-fenoles y una lactona (loliolida) o digiprolactana, entre otros ^{3,33,39, 40,50,51}.

Desde hace miles de años, cuando el hombre halló sustancias curativas o paliativos para las enfermedades en las hojas, raíces, cortezas, semillas, frutos o flores de plantas silvestres, se inició lo que se conoce como herbolaria o medicina tradicional herbolaria. Comenzó a establecerse una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una, distinguiendo una planta de otra por las características externas más notorias y por su aroma, ya que aún no se establecía lo que hoy se conoce como taxonomía vegetal⁵⁸.

A partir del conocimiento etnobotánico y herbolario se iniciaron las investigaciones para conocer los principios activos presentes en las plantas más conocidas y esto dio origen a la rama de la Ciencia que es la Fitoquímica⁵⁸.

Una diferencia importante entre el reino vegetal y el animal es la capacidad de las plantas y los hongos para producir sustancias esenciales para sobrevivir, la determinación de la presencia de estas sustancias, su análisis y la búsqueda de su actividad biológica constituyen el objetivo de la Fitoquímica^{59,60}.

Las plantas poseen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios que le permiten crecer, multiplicarse, defenderse y sobrevivir. El metabolismo secundario de las plantas puede definirse como el nivel funcional del metabolismo

que, aunque no es indispensable para el crecimiento y desarrollo del vegetal, lo es para la supervivencia de la especie ⁶¹.

Los metabolitos primarios presentes en los vegetales son: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminos, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, los que a su vez producen metabolitos secundarios, que son sustancias que no participan de forma directa en el crecimiento o desarrollo, es decir, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno, ya sea como mecanismo de defensa contra predadores o como materia de almacenamiento ^{62,63}.

Familias de metabolitos secundarios. Aunque hay alguna discrepancia en la clasificación de estas familias, la más general los clasifica en 4 principales clases ⁶⁰.

1. Terpenos. Entre ellos hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
2. Compuestos fenólicos. Flavonoides, cumarinas, lignina y taninos.
3. Glicósidos. Saponinas, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
4. Alcaloides.

Preparación de extractos

A nivel popular basta con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos, de acuerdo a los antecedentes encontrados, de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las

propiedades medicinales de una droga vegetal, se recurre a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible ⁵⁸.

Los métodos extractivos más empleados son:

- A) Maceración: frío o en calor,
- B) Lixiviación,
- C) Soxhlet
- D) Arrastre por vapor de agua.

Extracción por Maceración

Este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción ⁶⁴.

Extracción por Lixiviación

En este método de extracción se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido, este proceso se utiliza industrialmente para preparar elixires; el material vegetal fresco se coloca en un recipiente a

temperatura ambiente, durante 3 días, con acetona o algún otro solvente o mezcla de solventes, sin ser necesario cortar en trozos dicho material. Después de este tiempo se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor (Figura 2), (se puede emplear otro solvente o agua) ⁶⁵.



Figura 2: Rotaevaporador (Aparato utilizado para la obtención del extracto)

Extracción por Soxhlet

Este es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet, donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante horas o días. La

extracción de los extractos se puede realizar de la siguiente manera: Parte aérea (flores, fruto, semillas, hojas, tallo) y raíz. El estudio fitoquímico puede ser de la planta completa o una de sus partes para un análisis específico ⁵⁷.

Arrastre por vapor

Se utiliza principalmente para aceites esenciales. Los aceites esenciales (AE) contienen compuestos orgánicos volátiles o aromáticos, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae preferentemente por arrastre de vapor mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica ⁵⁷.

Identificación y separación de metabolitos

Cromatografía Capa Fina

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica rápida y sencilla, que permite separar una mezcla de compuestos, determinar el grado de pureza y realizar el seguimiento de una reacción química ⁵⁷.

Cromatografía en Columna

La cromatografía en columna es un método utilizado para la separación y purificación, de diferentes compuestos orgánicos que se encuentren en estado sólido o líquido ⁵⁷.

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes antiinfecciosos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica ⁶⁶.

Para que los estudios de sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos tengan aplicación y validez clínica, es necesario que los procedimientos de laboratorio que la investigan sean confiables ⁶⁷.

La prueba de sensibilidad utilizando el procedimiento del disco es una modificación de la técnica descrita por Bauer, Kirby, Sherris y Turk; es la técnica que se recomienda para los laboratorios clínicos. La prueba es rápida, práctica y reproducible. Los procedimientos de diluciones en agar o diluciones en caldo para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los antimicrobianos son también procedimientos satisfactorios ⁶⁷.

Bacterias que forman parte de infecciones odontógenas

La cavidad bucal contiene la más variada población de bacterias, situadas sobre la mucosa, en las superficies dentarias y en el interior de los surcos

creviculares. Estos microorganismos pueden causar infecciones cuando acceden a los tejidos profundos rompiendo el equilibrio de la ecología bucal ⁶⁸.

Las bacterias aerobias involucradas en las infecciones odontogénicas son los estreptococos, que representan aproximadamente el 90%, y los estafilococos el 5%. Entre las bacterias anaerobias existe mayor abundancia de especies; entre las más comunes están los cocos grampositivos y los bacilos gramnegativos ^{69,70}.

De todos los microorganismos grampositivos, *Actinomyces* y todas sus especies identificadas se consideran comensales normales del ser humano, algunas especies como *A. viscosus*, *A. naeslundii* y *A. odontolyticus* tienen menor patogenicidad. En cambio, *A. israelii* está más implicado en actinomicosis cervicofacial y tumores del maxilar ^{71,72}.

Las especies de *Peptostreptococo*, bacteria coco grampositiva anaerobia, coexisten con otros microorganismos y son potencialmente patógenos. Se hallan frecuentemente en abscesos periapicales, pericoronaritis, periimplantitis, e infecciones pulpares ^{68,73}.



ESTADO DEL ARTE



Se evidencian estudios en diferentes partes del mundo que han demostrado la capacidad antimicrobiana del género *Plantago* y algunas de sus especies ⁷⁴⁻⁸⁶.

En Estados Unidos se realizó un estudio para determinar la efectividad *in vitro* del extracto de *P. major*, junto con dos de sus componentes activos, la aucubina y la baicaleína, en la inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, la formación de biofilm, la actividad metabólica y la hidrofobicidad de la superficie celular. La concentración inhibitoria mínima del extracto de *P. major* (diluido 1: 2 a 1: 8), aucubina (61 a 244 µg / ml) y baicaleína (0,0063 a 100 µg / ml) sobre el crecimiento total de *C. albicans* fueron notables en sus concentraciones más altas, y la inhibición fue dependiente de la dosis. La concentración fungicida mínima (MFC) se evaluó después de 48 horas de incubación, y la aucubina (244 µg / ml) mostró una fuerte actividad fungicida en su concentración más alta contra el crecimiento de *C. albicans*. La concentración inhibitoria mínima de biopelícula (MBIC) de cada solución no indicó crecimiento o crecimiento reducido de biofilm de *C. albicans* en las concentraciones más altas de aucubina (61 a 244 µg / ml) y baicaleína (25 a 100 µg / ml). De manera similar, los efectos de estos reactivos sobre la actividad metabólica y la hidrofobia del biofilm de *C. albicans* demostraron una alta efectividad en sus concentraciones más altas. El extracto de *P. major*, la aucubina y la baicaleína causaron una reducción dependiente de la dosis sobre el crecimiento total, la formación de biofilm, la actividad metabólica y la hidrofobicidad de la superficie celular de *C. albicans*. Esto demuestra su eficacia como antifúngicos y sugiere su uso potencial prometedor como soluciones para las infecciones relacionadas con el biofilm de *C. albicans* ²¹.

Un estudio realizado en Iraq ha demostrado la actividad antimicrobiana de *P. major*. El extracto de metanol de *P. major* produjo zonas de inhibición contra bacterias Gram positivas: *Lactobacillus sp.* es sensible a los rangos de concentración de 1000-250 (mg / ml) y el *Staphylococcus aureus* sensible a los rangos de concentración de 1000 a 125 (mg / ml). También se producen zonas de inhibición contra bacterias Gram negativas: *-Pseudomonas aeruginosa* sensible a los rangos de concentración de 1000 a 125 (mg / ml), *Proteus sp.* y *Escherichia coli* sensible a los rangos de concentración de 1000-250 (mg / ml), y *Enterococcus sp.* rangos de 1000-500 (mg / ml). El disolvente (control negativo) utilizado para la preparación en diferentes concentraciones no mostró actividad contra ninguna bacteria probada. La estreptomicina (control positivo) a una concentración de 125-1000 (mg / ml) mostró rangos de zona de inhibición de 40-23 mm contra todas las bacterias analizadas ⁸⁷.

Otro estudio realizado en México evaluó la acción antimicrobiana de ocho especies de plantas. La actividad antimicrobiana (AA) que ejercieron los extractos acetónicos tanto de hoja, tallos y semillas de las especies vegetales estudiadas, sobre las dos bacterias que fueron *Escherichia coli spp.* y *Bacillus cereus*. Contra *B. cereus* presentaron actividad *P. major* y *Peumus boldus* con halos de 1 ± 0.1 cm y 1.1 ± 1 cm, respectivamente. En cuanto a *E. coli* solamente los extractos acetónicos de *P. boldus*, *P. major* y *Cucurbita pepo* L. presentaron efecto. Los halos de inhibición fueron de 0.5 ± 0.1 , 0.5 ± 0.1 y 0.9 ± 0.1 cm respectivamente. El resto de especies vegetales no presentó ningún efecto, pese que hay evidencia de que pueden inhibir el crecimiento de varios patógenos ²².

En Perú un estudio comparó la actividad bacteriana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de tres plantas medicinales: *Plantago major* L. (llantén), *Erythroxylum novograntense var truxillense* (coca trujillo) y *Camellia sinensis* (té verde) mediante el método de difusión en agar con discos, sobre cinco cepas patrones de bacterias orales: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus*. ATCC 314, *Actinomyces viscosus* ATCC 15987, *Prevotella melaninogenicus* ATCC 25845 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Las soluciones fueron comparadas con PerioAid® (clorhexidina 0,012 %) como control positivo y con alcohol etílico al 70 %, como control negativo.

1. Los tres extractos hidroalcohólicos en las diluciones de 25 y 50 µg/mL presentaron actividad antibacteriana sobre *S. mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *A. viscosus*, *P. melaninogenicus* y *Fusobacterium nucleatum*. El efecto antibacteriano aumentó con la concentración en *P. melaninogenica*, que fue la cepa más sensible y *A. viscosus* la menos sensible.

2. De la comparación entre los extractos diluidos a 25 µg/mL, los resultados con mayores valores los presentó el extracto hidroalcohólico de *C. sinensis*, excepto sobre *A. viscosus*; mientras que los menores se observaron con el de *P. major* L.

3. De la comparación entre los extractos diluidos a 50 µg/mL, los resultados con mayores valores los presentó el extracto hidroalcohólico de *C. sinensis*, excepto sobre *F. nucleatum*, en cuyo caso los mayores valores los presento el extracto de *P. major* L.; en el resto de los casos esta última sustancia registro los menores resultados

Aún en la actualidad existen poblaciones en Argentina que optan por la utilización de plantas medicinales como tratamientos de diferentes patologías, entre ellas eligen al “llantén” como opción debido a sus distintos fines medicinales ¹⁴.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Determinar el perfil fitoquímico y la actividad antimicrobiana del llantén.

Objetivos específicos:

- Caracterizar el perfil fitoquímico del llantén de la Ciudad de Corrientes según las estaciones invierno y primavera.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del llantén frente a *Peptostreptococcus spp.* y *Actinomyces spp.*

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: El llantén es una planta con acción antibacteriana frente a *Peptostreptococcus spp.* y *Actinomyces spp.*

Hipótesis 0: El llantén es una planta sin acción antibacteriana frente a *Peptostreptococcus spp.* y *Actinomyces spp.*



DISEÑO METODOLÓGICO



El estudio es de tipo observacional con diseño experimental, transversal y cuantitativo.

La obtención, procesamiento y caracterización fitoquímica de los principios bioactivos se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación en Química Orgánica Biológica (QUIMOBIO) UTN en la ciudad de Resistencia, provincia del Chaco, en los meses de julio y octubre de 2019.

1. COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS VEGETALES:

Se realizó una bioprospección de poblaciones estables de *Plantago* en la ciudad de Corrientes, República Argentina (-27.4902341, -58.7712889). Los ejemplares se recolectaron y se enviaron algunas muestras representativas que se depositaron en herbario de referencia (IBONE-UNNE), siendo identificadas como *Plantago tomentosa* Lam y material vegetal en cantidad necesaria para la obtención de extractos³⁶. (figuras 3 y 4).

Los períodos estacionarios en el que han sido recolectados fueron en invierno (I)¹ y primavera (II).



Figura 3: Obtención *P. tomentosa* Lam. en la Ciudad de Corrientes.



Figura 4: Almacenamiento *P. tomentosa* Lam. para su correcta identificación.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

El material vegetal se separó en sus órganos partes aéreas (PA) y raíces (R) y se secaron por venteo a la sombra en el laboratorio.

Una vez secos, se procedió a la molienda con molinillo (tamiz 20) y se pesó en una balanza analítica para obtener el material vegetal de partida.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS POR MACERACIÓN:

Se colocó el material vegetal molido y seco en vasos de precipitados y se agregó etanol (EtOH 96 %) de manera que cubra el mismo, al menos un cm por encima del material.

Ejemplares recogidos en invierno: Partes aéreas: se agregó 540 ml de etanol (EtOH 96 %), para cubrir en su totalidad el material seco, previamente molido.

Raíces: se agregó 55 ml de etanol (EtOH 96 %) para cubrir en su totalidad.

Ejemplares recogidos en primavera: Partes aéreas: se agregó 650 ml de etanol (EtOH 96 %) para cubrir en su totalidad.

Raíces: se agregó 60 ml de etanol (EtOH 96 %) para cubrir en su totalidad.

Se dejó macerar durante 48 horas. Posteriormente se filtró utilizando papel de filtro Whatman N° 1. en un colador conectado al vacío.

El producto obtenido se concentró en un equipo de rotavapor al vacío (R-124 – Waterbath B-480), a temperatura menor de 60°C. El rendimiento que se obtuvo fue, por cada gramo de planta un mililitro de extracto (tabla 1).



Figura 5: Maceración de los productos vegetales.



Figura 6: Filtración al vacío del producto obtenido de la maceración.

Tamizaje fitoquímico y cromatografía

Análisis cualitativo que se le realiza a los extractos de plantas naturales para identificar los compuestos (por ej.: Alcaloides, Taninos, Flavonoides, Quinonas, etc.) que contiene dicho extracto.

Marcha fitoquímica:

Se pesaron 2 mg de extracto de cada grupo y se agregó 1 ml de etanol 96° en un vaso de precipitado (solución 2mg/ml) para utilizar como muestra en el estudio fitoquímico. (Figura 7) (Tabla 1)



Figura 7: Marcha Fitoquímica del extracto obtenido de *P. tomentosa* Lam.

A continuación, se detallan las técnicas cromatográficas necesarias para la identificación de los diferentes metabolitos.

Identificación de Alcaloides:

<u>ENSAYO DE DRAGENDORFF (ALCALOIDES)</u>	
Solución A:	0,6 g de subnitrito de bismuto 2 ml de ácido clorhídrico concentrado 10 ml de agua
Solución B:	6 g de ioduro de potasio 10 ml de agua
POSITIVO: en presencia de sales de alcaloides, precipitado amorfo de color rojo ladrillo.	

Identificación de Triterpenos y/o Esteroides:

<u>ENSAYO DE LIBERMAN- BUCHARD (TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES)</u>
Gotas de extracto
Gotas del reactivo (5 ml de anhídrido acético + 5 ml ácido sulfúrico concentrado, 50 ml de etanol absoluto)
Positivo: Verde o azul verdoso indica presencia de núcleo esteroidal.

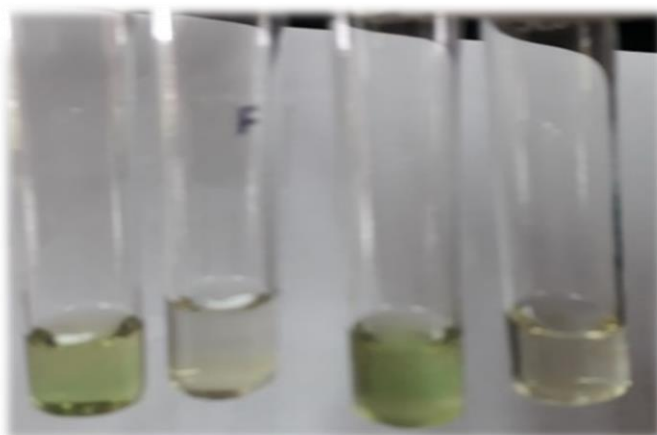


Figura 8: Identificación Esteroides

Identificación de Quinonas:

ENSAYO DE BORNTRAGER (QUINONAS)

Se adiciona 1mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco al 5 %.

El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) o rojo, para lo cual se reporta (+++).

Identificación de Flavonoides:

ENSAYO DE SHINODA (FLAVONOIDES)

En placa de toque, se agregan a unas gotas del extracto unas virutas de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Se observa cambio de coloración (de rojo a magenta).

Identificación de Cumarinas:

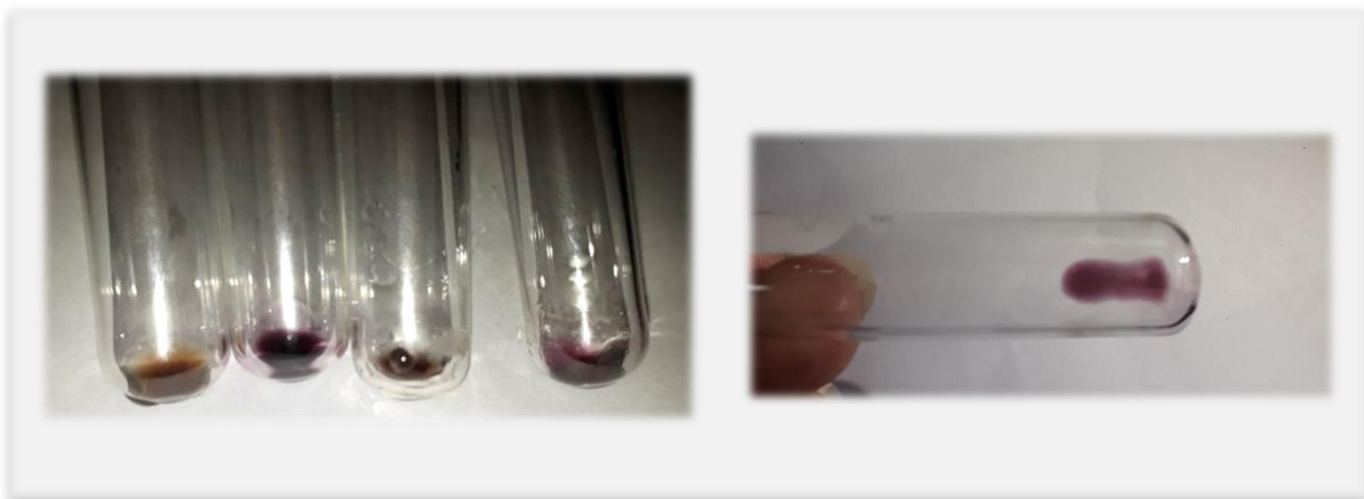
ENSAYO DE BALJET (CUMARINAS)

Se añade 1mL del reactivo

La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo (++) y (+++) respectivamente.

Identificación de Saponinas:

<u>SAPONINAS: REACTIVO VAINILLINA- ÁCIDO SULFÚRICO</u>
Solución I: ácido sulfúrico al 5% en etanol
Solución II: vainillina al 1% en etanol
Gotas del extracto
Gota de solución I
Gota de solución II
Calentar a Baño de María por 3-5'
POSITIVO: Coloración azul o azul violeta. Algunas pueden dar coloración amarilla.



Figuras 9: Identificación Saponinas –
coloración azul violeta -

Identificación de Taninos:

<u>TANINOS: Reacción con gelatina/ NaCl—placa o tubo</u>
Reactivo: 0,1 g de gelatina + 10 ml de agua + 1 g de NaCl
Gotas de extracto con el reactivo



Figura 10: Identificación Taninos

Identificación de Fenoles:

<u>FENOLES: Reacción con FeCl₃</u>
FeCl ₃ al 10 % en agua
Positivo: coloración verde a marrón para derivados de catecol y coloración azulada para derivados del pirogalol.

Identificación de Aminoácidos:

<u>AMINOÁCIDOS</u>
Ninhidrina al 0,1% en solución alcohólica
Positivo: color violeta con los aminoácidos

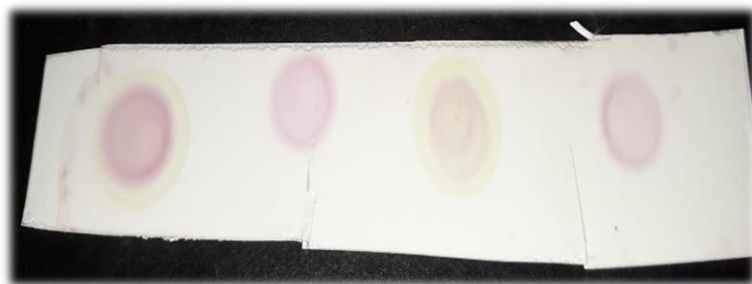


Figura 11: Identificación aminoácidos

Identificación de Glucósidos:

<u>AZÚCARES: Glucósidos</u>
Manosa + 0,5 g de timol en 95ml de etanol
Agregar 5 ml de ác. sulfúrico al 97%
Se calienta por 15 a 20 min a 120°C
Resultado: color rosado

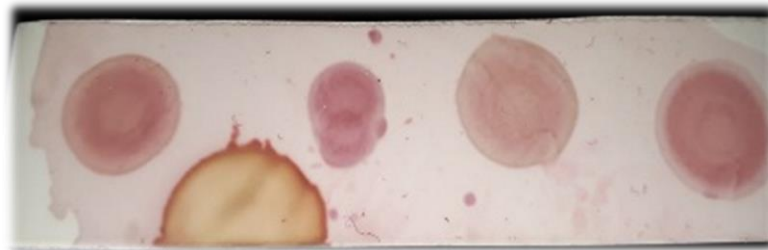


Figura 12: Identificación Glucósidos- Azúcares

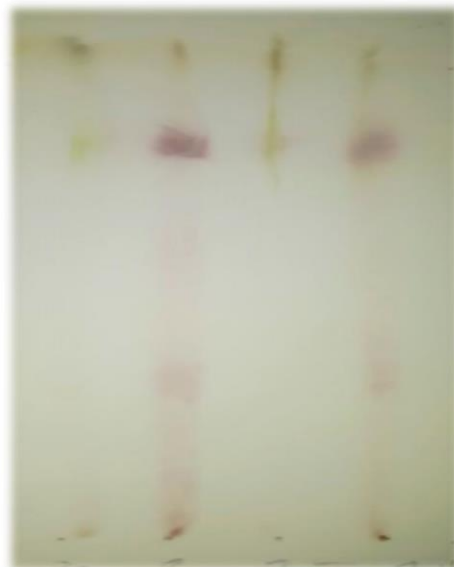


Figura 13: Identificación de glucósidos iridoides, a través de cromatografía en capa fina (TLC).

Ensayo microbiológico

Se ensayó la sensibilidad de los géneros *Peptostreptococcus* spp y *Actinomyces* spp. frente a extractos de *P. tomentosa* Lam. Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el Método de Kirby-Bauer por difusión en agar de Mueller-Hinton.

Obtención de cultivos

Desde un aislamiento primario se obtuvieron colonias de *Peptostreptococcus* spp y *Actinomyces* spp: se realizó un cultivo en un medio de Agar sangre para purificación e identificación bioquímica; se incubó en jarra de anaerobiosis a 37 °C durante 72 hs.

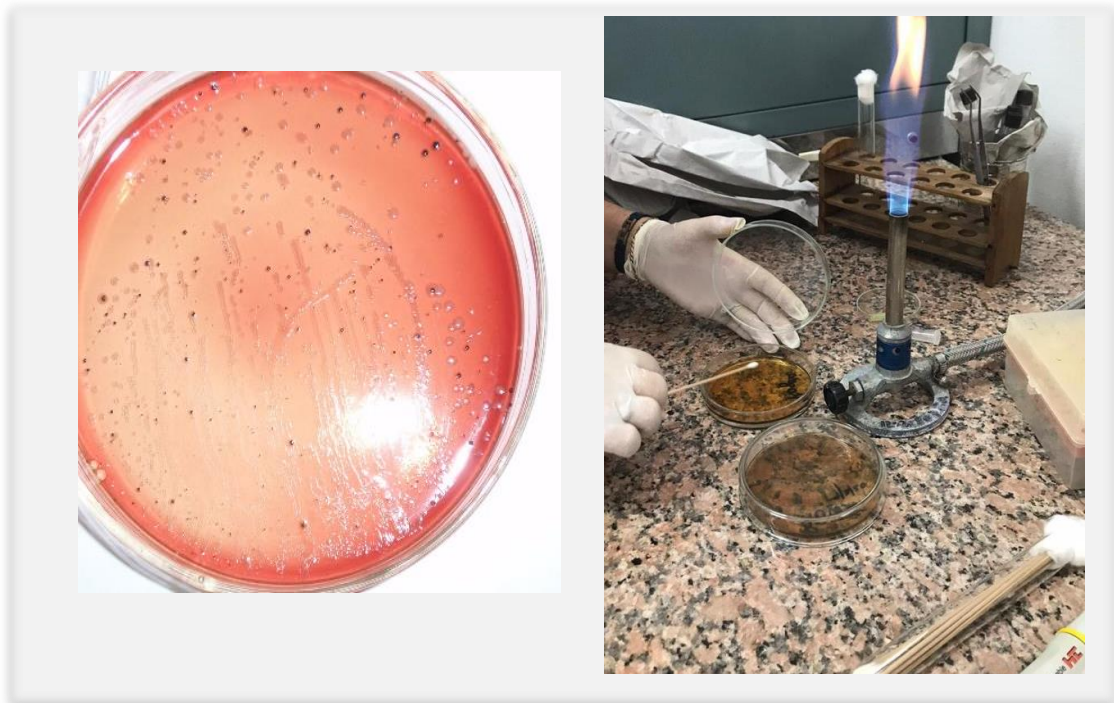


Figura 14: Aislamiento primario
Fuente: Laboratorio de Microbiología



Figura 15: Jarra anaerobiosis
Fuente: Laboratorio microbiología

Preparación de la solución de los extractos: Se prepararon soluciones al 25% y al 100% p/v de cada uno de los extractos en propilenglicol.

Se preparó un inóculo bacteriano correspondiente al 0,5 en la escala de Mc Farland correspondiente ($1,5 \times 10^8$ Ufc /ml) y se sembró con hisopo en superficie sobre la placa con agar de Muller-Hinton.

Preparación de los discos:

Se impregnaron discos de papel absorbente de calidad superior de 6 mm de diámetro cada uno, con 20 µl de la solución 25% y 100% (p/v) de cada uno de los extractos respectivamente.

Los discos fueron colocados sobre el agar de Muller-Hinton en forma equidistante, después de realizar la siembra. La placa se incubó en estufa de cultivo a 37°C durante 24 hs.

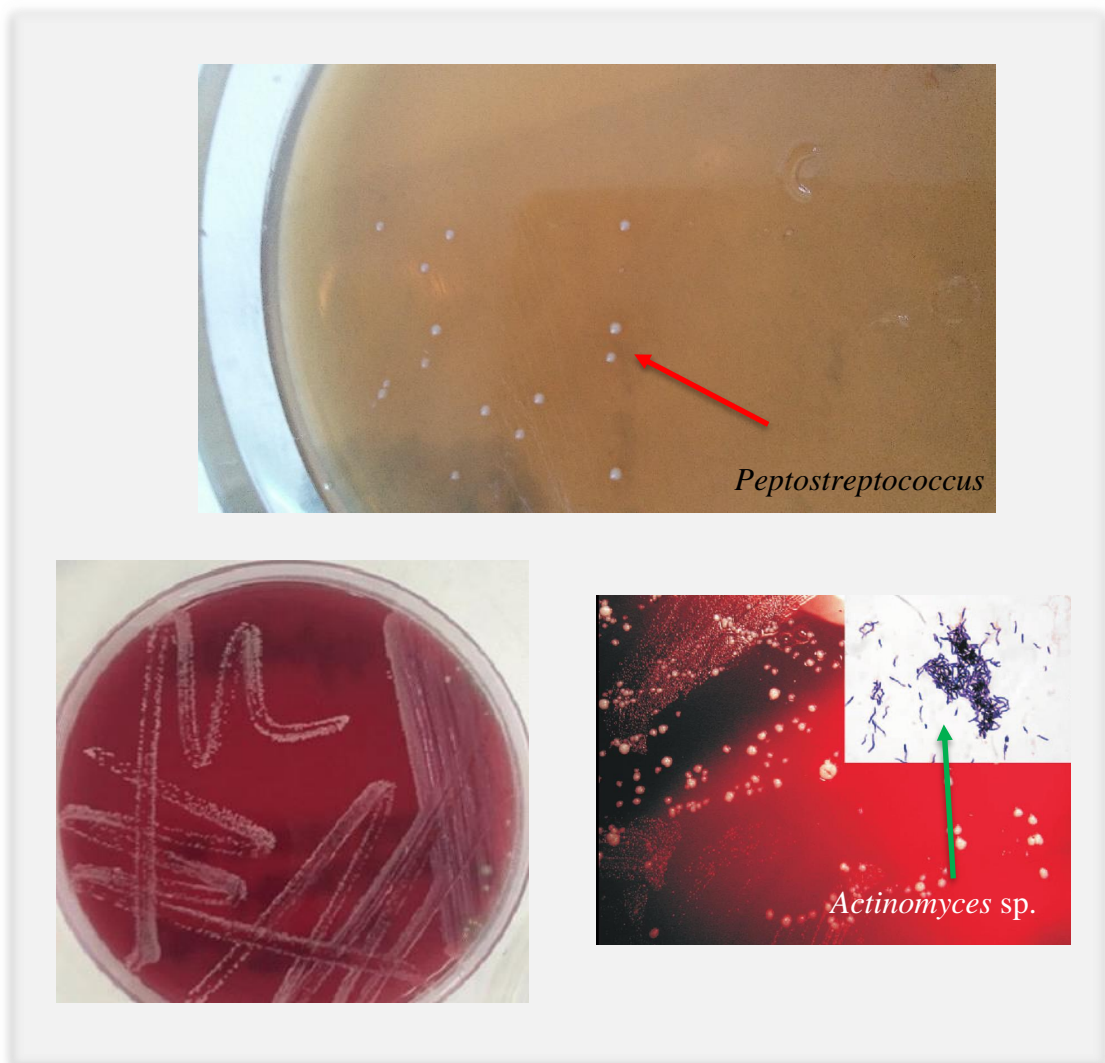


Figura 16 : Cepas de *Peptostreptococcus* sp. y *Actinomyces* sp.
Fuente: Laboratorio de Microbiología

Figura 17: Secuencia preparación de Mc Farland - Fuente: Laboratorio de Microbiología FOUNNE

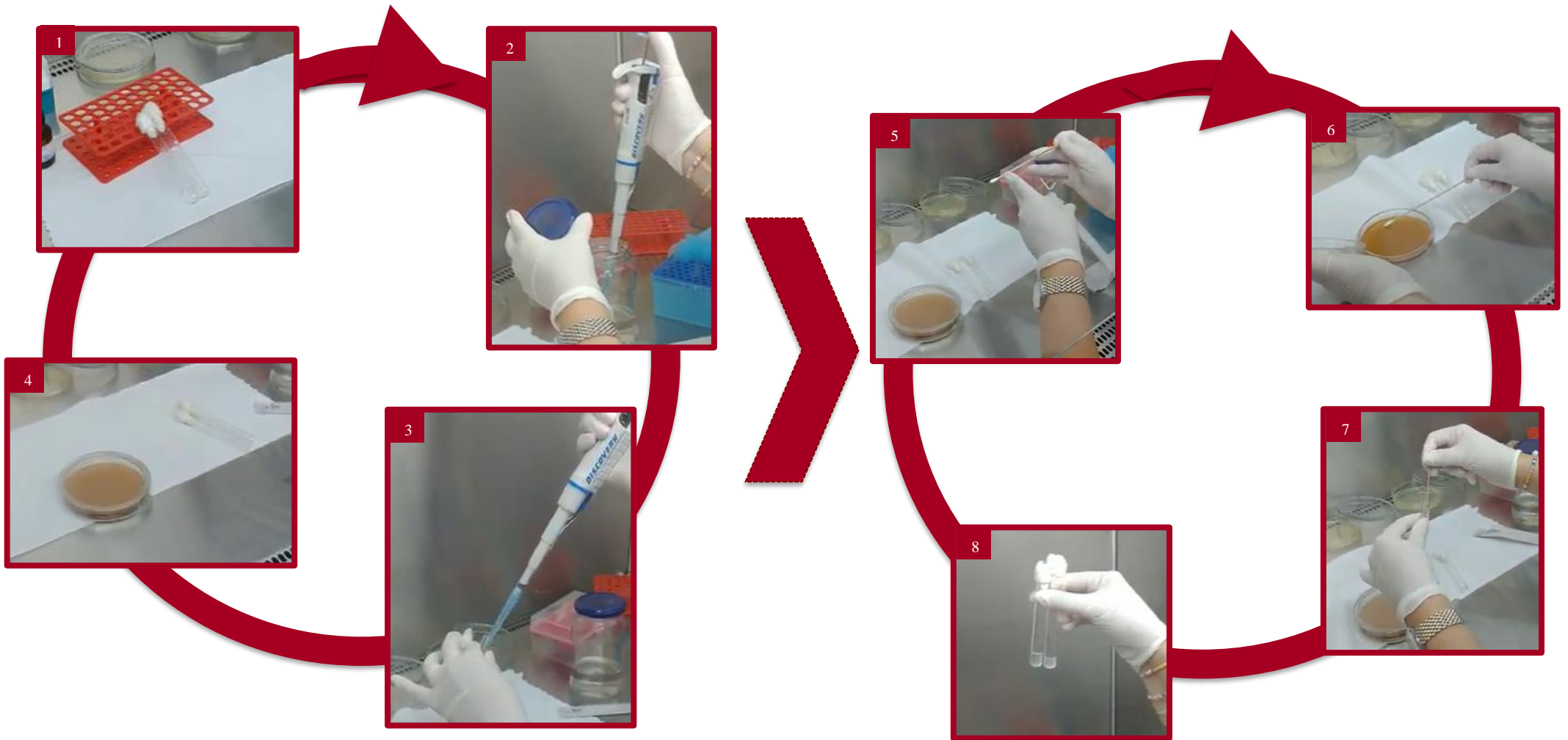




Figura 18: Dilución de los extractos

Como control negativo se utilizó un disco impregnado con solución fisiológica estéril. Como control positivo de sensibilidad un disco impregnado con 20 μ l de digluconato de clohexidina al 0,12% (Plac-out®, laboratorios Bernabo.Argentina).

Se utilizó también un disco impregnado con 20 μ l de propilenglicol, para evaluar la probable actividad antibacteriana del vehículo.

Todos los discos después de ser impregnados se dejaron secar en estufa a 35 °C. Se identificó cada disco separado por estaciones de la siguiente manera:

- Control negativo (-): Solución fisiológica
- Control positivo (+): Digluconato de clorhexidina al 0,12% (Plac Out®)

-Vehículo P: Propilenglicol

-Ae: Partes aéreas

-R: Raíces



Figura 19: Preparación para incubar en estufa



RESULTADOS



En el siguiente capítulo se presentarán los resultados obtenidos, el procesamiento de datos y la interpretación de los mismos, luego de la realización de los métodos descritos con anterioridad.

Para el análisis estadístico se utilizó análisis de varianza (ANOVA) y prueba de rango múltiple de Tukey en el programa InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina ⁸⁹.

En la tabla 1 se detalla el rendimiento obtenido luego del proceso de rotaevaporación. El rendimiento que se obtuvo fue por cada gramo de planta un mililitro de extracto.

Tabla 1: Preparación de extractos, rendimiento obtenido:

Material de invierno	PA2	R2
Material vegetal seco	26,1399 g	7,5816 g
extracto	1,7541 g	0,3989 g
rendimiento	6,7%	5,3%

Material de primavera	PAII2	RII2
Material vegetal seco	26,9471 g	3,6579 g
extracto	0,4788 g	0,2058 g
rendimiento	1,8%	5,6%

En la tabla 2 se puede observar el resultado del tamizaje fitoquímico realizado para tener conocimiento de que metabolito secundario presenta la especie en estudio *P. tomentosa* Lam.

Tabla 2: Resultado estudio fitoquímico e identificación de metabolitos secundarios.

Controles positivos	Familia de compuestos	Grupo I (PAI2)	Grupo II (RII2)	Grupo III (PA2)	Grupo IV (R2)
Cinconina	Alcaloides	+	-	+	+ -
Floroglucina	Fenoles	+	-	+ -	-
Extracto acuoso de Té negro	Taninos	++	+	++	+
Naringina	Flavonoides	-	-	-	-
-	Aminoácidos	+	+	+	+
Manosa	Azúcares	+	++	++	+++
-	Antraquinonas	-	-	-	-
-	Saponinas	-	+	-	+
-	Cumarinas	-	-	-	-
Colesterol	Esteroides o Triterpenos	++	+ -	++	+

Leyenda

(-) Negativo;
(+ -) Ensayo dudoso,
(+) Baja Presencia;
(++) Presencia;
(+++) Alta presencia

Los extractos de las PA de ambos períodos estacionarios presentaron los mismos compuestos químicos; taninos, azúcares, aminoácidos, esteroides y en menor medida alcaloides, fenoles y saponinas. Los extractos correspondientes a las raíces han reflejado alta presencia de azúcares en la muestra del período estacionario de invierno. Dando como positivo también la presencia de taninos, aminoácidos, saponinas y esteroides. Respecto a iridoides, por TLC se determinó la presencia de dos manchas color verde rojizo con frente de retención (R_f) 0,3 y 0,8 respectivamente en extractos alcohólicos de raíces de ambas estaciones. Destacando que ha sido identificado la presencia de los principales compuestos activos (iridoides).

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como frente de retención (R_f), y tiene un valor constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas específicas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.).

Los resultados obtenidos en la caracterización fitoquímica, nos reflejan que la especie estudiada en este trabajo, posee similitud con las especies estudiadas en diferentes partes del mundo.

Ensayo Microbiológico

TABLA 3. Comparación de los halos de inhibición en mm sobre *Peptoestreptococo spp* entre las concentraciones del llantén.

REPETICIONES	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO			
	Llantén 25 %	Llantén 100 %	Clorhexidina 0,12% control +	Solución fisiológica control -
Repetición 1	0	2	4	0
Repetición 2	4	6	4	0
Repetición 3	4	14	4	0
Repetición 4	4	8	4	0
Media Aritmética	3	7,5	4	0

En la Tabla 3 podemos apreciar que el llantén a una concentración de 25 % mostró un halo de inhibición promedio de 3 mm, en tanto a una concentración de 100 % el halo de inhibición fue mayor alcanzando un valor en promedio de 7,5 mm, siendo este valor mayor al grupo de control positivo con Clorhexidina 0,12% en donde el promedio del halo fue de 4 mm.

TABLA 4. Comparación de los halos de inhibición en mm sobre *Actinomyces spp.* entre las concentraciones del llantén.

REPETICIONES	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS			
	Llantén 25 %	Llantén 100%	Clorhexidina 0,12% control +	Solución fisiológica control -
Repetición 1	0	0	6	0
Repetición 2	0	2	6	0
Repetición 3	0	2	6	0
Repetición 4	0	2	6	0
Media Aritmética	0	1,5	6	0

En la Tabla 4 podemos apreciar que el llantén a una concentración de 25 mg mostró un halo de inhibición nulo de 0 mm, en tanto a una concentración de 100 mg el halo de inhibición fue en promedio de 1,5 mm, siendo este valor menor al grupo de control positivo con Clorhexidina 0,12% en donde el promedio del halo fue de 6 mm.

Tabla 5. Análisis de Varianza de los extractos sobre *Peptostreptococcus*

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
25 mg	4	12	3	4
100 mg	4	30	7,5	25
control +	4	16	4	0
control -	4	0	0	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	114,75	3	38,25	5,27586207	0,01495955	3,49029482
Dentro de los grupos	87	12	7,25			
Total	201,75	15				

Tras la prueba de ANOVA se encontró diferencias estadísticamente significativas para los grupos independientes ($p < 0,05$).

Tabla 6: Para identificar que grupos son diferentes se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey.

HSD	5,654423047
Multiplicador	4,2
MSe	7,25
N	4

La diferencia honestamente significativa (HSD) es de 5,65

	A (25 mg)	B (100 mg)	C (control +)	D (control -)
A (25 mg)		-4,5	-1	3
B (100 mg)			3,5	7,5*
C (control +)				4
D (control -)				

*Único valor por encima de HSD.

Se puede determinar que existe diferencia entre los grupos B (100 mg) y D (control -) por lo que el efecto antibacteriano del llantén sobre *Peptostreptococcus spp* es similar al efecto antibacteriano de la clorhexidina que se usó en el grupo C (control +).



Figura 20: Inhibición del extracto.
Fuente: Laboratorio de
Microbiología Founne

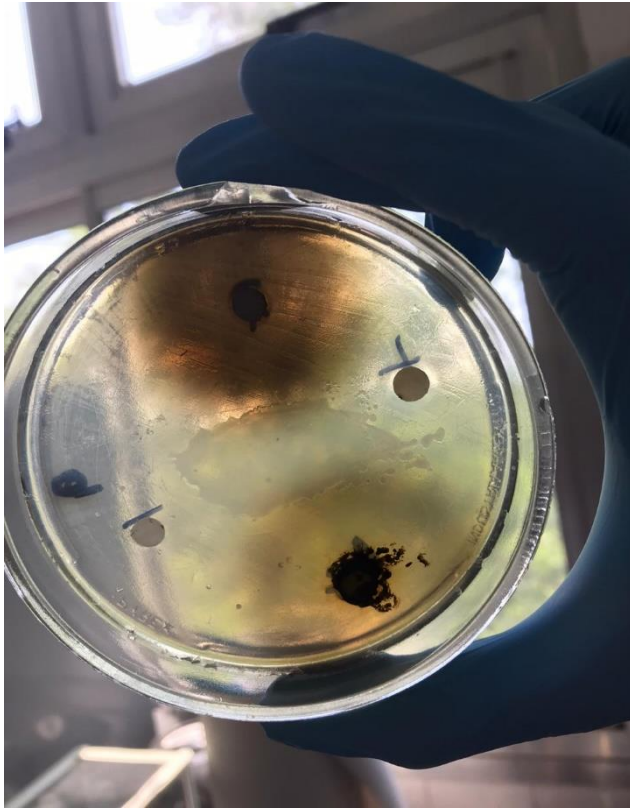


Figura 21: Caja de Petri con extractos.
Fuente: Laboratorio de Microbiología Founne

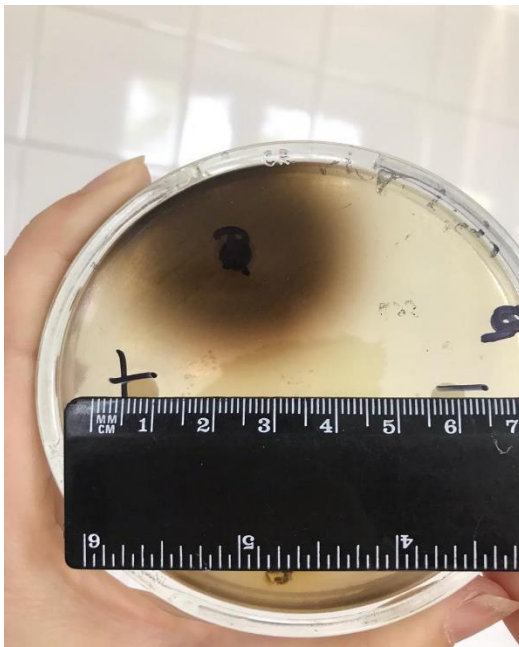


Figura 22: Control negativo. Fuente:
Laboratorio de Microbiología Founne

Tabla 7. Análisis de Varianza de los extractos sobre *Actinomyces spp.*

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
25 mg	4	0	0	0
100 mg	4	6	1,5	1
control +	4	24	6	0
control -	4	0	0	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	96,75	3	32,25	129	2,1421E-09	3,49029482
Dentro de los grupos	3	12	0,25			
Total	99,75	15				

Tras la prueba de ANOVA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los grupos independientes ($p < 0,05$).

Las concentraciones utilizadas de extractos de llantén no presentaron inhibición antimicrobiana diferentes al grupo de control positivo, esto podría deberse a que los halos inhibitorios en estos grupos fueron mínimos o escasos.



DISCUSIÓN



La tendencia actual al empleo de productos naturales como terapia en diversas afecciones, ha motivado a la realización de este trabajo en búsqueda de una nueva alternativa terapéutica natural, basada en la fitoterapia como coadyuvante para el tratamiento de diversas patologías, siendo uno de estos recursos el *Plantago tomentosa* Lam., popularmente conocido como llantén en nuestra región.

Debido a los escasos estudios realizados en nuestra región sobre la especie antes mencionada y teniendo poca referencia de su fitoterapia y su actividad antimicrobiana, el trabajo de investigación realizado se enfoca en su actividad antibacteriana frente a algunos patógenos orales. Los resultados obtenidos de la caracterización fitoquímica, nos refleja que *P. tomentosa* Lam., presenta similitud de componentes a las demás especies estudiadas del mismo género.

Aunado a esto, en un estudio realizado en Perú sobre el extracto hidroalcohólico de *Plantago major* L. y su efecto antibacteriano sobre cultivos de *Streptococcus pyogenes* se observó similares resultados en el perfil fitoquímico con respecto al alto contenido de tanino y diferencias en alcaloides y fenoles ya que ellos obtuvieron mediciones moderadas a abundantes, esto puede deberse a la diferencia de las técnicas empleadas ⁸¹.

Otro estudio realizado también en Perú sobre la Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de *P. major* (llantén) Y *Rumex crispus* (lengua de vaca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* – PUNO 2017. presento alcaloides y fenoles en

mediana cantidad y poca cantidad de taninos, utilizando las mismas técnicas que este trabajo ⁷⁹.

Entre los diversos principios activos que presenta el *Plantago* lo cual se ha corroborado en este estudio, el de mayor importancia con respecto a su actividad antibacteriana es un glucósido iridoides, aucubina, que según Davini ⁵¹, Vázquez Nuñez ⁸⁰, Rilka Taskovaa ⁷⁸ es el responsable de la actividad antimicrobiana generando la hidrólisis de proteínas de algunas bacterias. La mayor cantidad de iridoides se detectó en las raíces del período estacionario primavera. Es importante destacar las diferencias encontradas entre la parte aérea y la raíz de este compuesto, sin embargo, no se han encontrados estudios que realicen la diferenciación del perfil fitoquímico en ambas partes, pero si diferenciando hábitat y estación que coincidieron con los resultados obtenidos en este trabajo, donde la actividad antibacteriana fue representativa en las raíces de invierno. Probablemente las temperaturas frías hagan que la planta concentre el componente.

Es así como, un trabajo realizado por Manar A. Soliman ⁹ donde el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólico y cloroformo de hojas de *P. major* de diferentes hábitats en diferentes estaciones mostró la presencia de glucósidos cardíacos, flavonoides y fenoles. Los contenidos más altos de glucósidos cardíacos y flavonoides totales se observaron en hábitats urbanos y cultivos durante el invierno, mientras que el contenido fenólico total más alto se observó en tierras en barbecho durante el verano. Los contenidos fitoquímicos y la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas difieren con los factores ambientales (hábitat y estación) ⁹.

En un estudio hecho en Brasil por Nascimento et al ⁹⁰, en donde utilizaron la misma medición que este trabajo, se determinó que cualquier resultado que sobrepase 1 mm el diámetro del disco de filtro de 6 mm indica eficacia inhibitoria contra las poblaciones bacterianas ^{90,91}. Nuestros resultados indicaron que el extracto etanólico de *Plantago tomentosa* Lam. posee eficacia inhibitoria *in vitro* sobre *Peptostreptococcus spp* en concentraciones de 100%. Ha demostrado tener similar inhibición antibacteriana que la clorhexidina 0,12%.

Al respecto, Sepideh Safari, et al.⁹² realizaron un estudio donde se obtuvo un diámetro medio de la zona de inhibición del crecimiento de 15 ± 1 mm para el extracto hidroalcohólico de hojas de *P. major* con nanopartículas de óxido de zinc a una concentración de 1,56 mg/ml. El mismo extracto a la misma concentración, pero sin nanopartículas de óxido de zinc, mostró un diámetro medio de la zona de inhibición del crecimiento de $7,67 \pm 0,57$ mm.⁹² La prueba t fueron indicativos de una diferencia significativa entre los dos grupos (valor P <0,001). En este estudio, el efecto antimicrobiano del extracto de hojas de *P. major* con o sin nanopartículas de óxido de zinc fue bien establecido ⁹².

Como así también, Basma Monjd Abd Razik, et al.⁸⁷ publicó que el extracto de metanol de *P. major* produjo zonas de inhibición contra bacterias Gram positivas: *Lactobacillus sp.* es sensible a los rangos de concentración de 1000-250 (mg / ml) y el *Staphylococcus aureus* sensible a los rangos de concentración de 1000 a 125 (mg / ml). También se producen zonas de inhibición contra bacterias Gram negativas: - *Pseudomonas aeruginosa* sensible a los rangos de concentración de 1000 a 125 (mg

/ ml), *Proteus* sp. y *Escherichia coli* sensible a los rangos de concentración de 1000-250 (mg / ml), y *Enterococcus* sp. rangos de 1000-500 (mg / ml) ⁸⁷.

El trabajo de Alvarado, et al.²³ también demuestra que los tres extractos hidroalcohólicos en las diluciones de 25 y 50 µg/mL del llantén presenta actividad antibacteriana frente a otras bacterias, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella melaninogenica* y *Fusobacterium nucleatum*. El efecto antibacteriano aumentó con la concentración en *P. melaninogenica*, que fue la cepa más sensible y *A. viscosus* la menos sensible²⁰ con los que coincidimos en los resultados respecto a *Actinomyces*.

Al igual que estudios realizados por Teles, DG. et al.⁵⁶ frente a otras bacterias en Brasil, estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de Tansagem (*P. major* L., *Plantaginaceae*) e Romã (*Punica granatum* L., *Punicaceae*) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina *in vitro* ⁹³ el extracto de *P. major* no presentó actividad contra bacterias las bacterias en concentraciones 6,25% *Streptococcus aureus* y 25% contra *Escherichia coli* ⁵⁶.

Sin embargo, Zoran Tambur et al.⁹³, demostraron que las actividades más fuertes del extracto de etanol de *Plantago lanceolata* se observó contra *Actinomyces odontolyticus* y *Eikenella corrodens* (MIC = 37,5 µg/ml), mientras que *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* tenía concentración inhibitoria mínima de 75 µg/ml al igual que *Lactobacillus acidophilus* y *Fusobacteria nucleatum*. Por otro lado, el extracto de etanol de *P. major* no mostró ninguna actividad contra los colonizadores

primarios de la placa o patógenos periodontales ⁹³. Lo cual nos genera la ventana para seguir investigando con otros grupos patógenos.



CONCLUSIONES



El llantén posee diversos efectos terapéuticos, entre ellos el antibacteriano, hemos podido comprobar que la especie que se encuentra con facilidad en nuestro medio el *P. tomentosa* Lam, contiene los metabolitos primarios y secundarios responsables de dicha actividad.

Además, presenta inhibición antimicrobiana *in vitro* frente a *Peptoestreptococcus* spp según los resultados obtenidos, no así frente a las cepas de *Actinomyces* spp, permitiendo confirmar la hipótesis frente a *Peptoestreptococcus* spp, siendo inconcluyente el resultado para las cepas de *Actinomyces* spp; estos resultados podrían suscitar modificaciones a dosis más altas del extracto, intención que motivaría investigaciones futuras sobre la acción que ejerce la aucubina sobre especies bacterianas poco sensibles.

Se puede concluir que el *P. tomentosa* Lam, podría facilitar los tratamientos de diversas enfermedades bucales provocadas por *Peptostreptococcus* spp., generando una buena alternativa de uso, debido a las escasas opciones terapéuticas que se encuentran en el mercado farmacéutico odontológico.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Hernández Rodríguez A. Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. La Habana, Cuba. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Vol 4 nº 4, mayo 2005. Latindex ISSN 0717 7917
2. Alonso J, Desmarchelier CJ. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus Libros Médicos y Científicos. 2015. 748 p. ISBN 978-987-1860-25-8 1.
3. Fernández Castañón C. Plantas medicinales: ¿cómo las usan guaraníes, criollos y polacos? CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 2017. <http://www.conicet.gov.ar/plantas-medicinales-como-las-usan-guaranies-criollos-y-polacos/>
4. Pushkareva VI., Slezina MP, Korostyleva TVpuchkare. Antimicrobial activity of wild plant seed extracts against human bacterial and plant fungal pathogens. American Journal of Plant Sciences, 2017, 8, 1572-1592 <http://www.scirp.org/journal/ajps>. ISSN Online: 2158-2750. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.87109>
5. Organización Mundial de la Salud. 31º Asamblea Mundial de la Salud. Ginebra: OMS. 1978. Actas oficiales de la Organización Mundial de la Salud: 248.
6. Lien-Chai Chiang, Wen Chiang, Mei-Yin Chang, Chun-Ching Lin. *In vitro* cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiática*. The American Journal of Chinese Medicine. 2003. Vol. 31(2), 225–234. <https://doi.org/10.1142/s0192415x03000874>
7. World Health Assembly, 39. 1986. Expert conference on the rational use of medicines (Nairobi, Kenia, 25 -29 de noviembre de 1985): Report of the

- Director- 82 General. World Health Organization. Disponible en:
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/200411>
8. Bolaños R. Uso racional de medicamentos. Organización Panamericana de la Salud. Organización mundial de la salud. Ministerio de Salud Presidencia de la nación Argentina. 2017. Disponible en: <https://salud.gob.ar/dels/printpdf/138>
 9. Manar A. Soliman, Tarek M. Galal, Mona A. Naim, Ahmed A. Khalafallah. Seasonal variation in the secondary metabolites and antimicrobial activity of *Plantago major* L. from egyptian heterogenic habitats. Egyptian Journal of Botany. 2022. Vol. 62, No. 1, pp. 255-273 <http://ejbo.journals.ekb.eg/>.
<https://dx.doi.org/10.21608/ejbo.2021.94145.1778>
 10. Strategy on Traditional Medicine. 2014-2023. WHO-World Health Organization. Disponible en:
<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
 11. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. [Publicación en Internet] 2005. [acceso 15 de septiembre de 2021]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf
 12. Rodríguez LM. Etnobotánica maya: Algunas plantas de uso medicinal en estomatología. Revista ADM. 2015; 72 (1): 21-25. www.medigraphic.com/adm
 13. Rivera Butrón B D. Efecto de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos hidroalcoholicos a base de llantén (*Plantago Mayor*) y té verde (*Camellia Sinensis*), a la concentración del 25%, 50% y 100% sobre *Streptococos Mutans* [Tesis]. Arequipa: Universidad Católica De Santa María; 2015.

14. Oliva, M. Usos y costumbres sobre hierbas medicinales en barrios periurbanos del sudeste de la ciudad de Salta, Argentina. Archivos de medicina familiar y general. 2016. Vol. 13(1).
15. Hernández Rodríguez A. Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2005. Volumen 4 (4), p. 71. Latindex. ISSN 07177917.
<http://www.blacpma.cl>
16. Sabag Asfura VA, Pinto Dávalos J, Zabalaga Vía S, et al. Formulación de un fitomedicamento con actividad gastroprotectora a partir de extractos de llantén (*Plantago major*). Biofarbo. 2010. 18(2). 44 – 52. ISSN 1813-5363
17. Goncalves S, Romano A. The medicinal potential of plants from the genus *Plantago* (Plantaginaceae). Industrial Crops and Products 83 (2016) 213–226.
www.elsevier.com/locate/indcrop.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.038>
18. Asolini FC, Tedesco AM, Carpes ST. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. Braz. J. Food Technol. 2006. v.9(3). p. 209-215.
<https://www.researchgate.net/publication/237481051>.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000003>
19. Sebnem Harput U, Genc Y, Saracoglu I. Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. Food and Chemical Toxicology. 2012. Vol. 50. 1554–1559.
www.elsevier.com/locate/foodchemtox.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.019>

20. Younes Najafian, Shokouh Sadat Hamedi, Masoumeh Kaboli Farshchi, et al. *Plantago major* in traditional persian medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electronic Physician*. 2018. Vol: 10 (2), Pages: 6390-6399. <http://www.ephysician.ir>. <https://doi.org/10.1111/jopr.12411> . ISSN: 2008-5842
21. Pezo SK, Windsor LJ, Eckert GJ, et al. *In Vitro* Effects of *Plantago Major* Extract, aucubin, and baicalein on *Candida albicans* biofilm formation, metabolic activity, and cell surface hydrophobicity. *Journal of Prosthodontics* 00 (2015) 1–8 C 2015 by the American College of Prosthodontists. <https://doi.org/10.1111/jopr.12411>
22. Castillo Archila JA, Trejo Díaz GN, Caballero Roque A. Evaluación del efecto antibacteriano de extractos de ocho plantas del estado de Chiapas. *Lacandonia*. 2016. vol. 10 (1). 7-10. <https://hdl.handle.net/20.500.12753/1871>
23. Alvarado Villanueva V, Moromi Nakata H. Plantas medicinales: Efecto antibacteriano *in vitro* de *Plantago major* L, *Erythroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camellia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. *Odontología Sanmarquina*. 2010; 13(2): 21-25. ISSN: 1560-9111.
24. Morales Segura MA, Morales Montecinos JP. Plantas medicinales, fitofármacos y fitomedicamentos: hacia una fitomedicina basada en la evidencia científica. *Research gate*. 2009. Pp 1-13. ISBN 978-956-319-864-5. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/281747269>.
25. Rodríguez Y, Luxfanay V, Moreno K. Conocimiento sobre el uso del *Plantago-major* como terapia alternativa en lesiones inflamatorias bucales. *RevVenezInvestOdont IADR*. 2014. 2 (2). 106-115. Depósito Legal: PP 199902DF816 ISSN: 2343-595X. <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/rvio>

26. Yambay Calderón P F. Elaboración y control de calidad de una crema a base de los extractos hidroalcoholicos de berro (*Nasturtium Officinale*) y llantén (*Plantago Major*) y comprobación de su actividad cicatrizante en heridas inducidas en ratones. [Tesis]. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior politécnica de Chimborazo. Facultad de ciencias, Escuela de bioquímica y farmacia. 2013
27. Braga Monteiro dos Reis L, de Lima Farias A, de Paula Bollella Â. Conhecimentos, atitudes e práticas de cirurgiões-dentistas de Anápolis-GO sobre a fitoterapia em odontología. Rev Odontol UNESP. 2014. 43(5): 319-325. ISSN 1807-2577. <https://doi.org/10.1590/rou.2014.051>
28. Mazzutti Simone AS, Riehl C, Ibañez E, et al. Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. Journal of Supercritical Fluids (2017). Vol 119. 211-220. doi: 10.1016/j.supflu.2016.09.018.issn:0896-8446.e-issn: 1872-8162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.09.018>
29. Najib Ahmad, Alam Gemini, Halidin Musdalifah. Insolation and identification of antibacterial compound from diethyl ether extract of *Plantago major*. Phcog J. 2012. Vol 4(31) <https://doi.org/10.5530/pj.2012.31.11>
30. Machado Herrera JR. Análisis *in vitro* del efecto antimicrobiano del *Plantago major* L. (Llantén) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. [Tesis]. Riobamba – Ecuador. Universidad Nacional De Chimborazo Facultad De Ciencias De La Salud Carrera De Odontología; 2017
31. Flores A, Yoneka S, Acebey A, et al. Inhibición de *Staphylococcus Aureus* mediante la actividad antibacteriana de plantas medicinales bolivianas. SCientifica. 2009 Vol.7(1)

32. Dousseau S, Alves de Alvarenga A, de Oliveira Arantes L. Germinação de sementes de tanchagem (*Plantago tomentosa* Lam.): influência da temperatura, luz e substrato. Ciênc. agrotec., Lavras. 2008. v. 32(2), p. 438-443. <http://doi.org/10.1590/s1413-70542008000200014>
<https://www.researchgate.net/publication/262500320>
33. Trillo C, Arias Toledo B, Colantonio S. Revisión de la etnomedicina en Argentina: construcción de la disciplina y perspectivas para el futuro. Bonplandia. 2011; 20(2): 405-417.
34. Blanco B, Saborío A, Garro G. Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (llantén mayor) Tecnología en Marcha. 2008. Vol. 21(2). P. 17-24
35. da Cruz Magalhães Buffon M; da Costa Lima ML, et al. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. Revista Visão Acadêmica, Curitiba. 2001. v. 2(1), p. 31-38
<http://dx.doi.org/10.5380/acd.v2i1.485>
36. Corrales Reyes IE, Reyes Pérez JJ. Actividad etnofarmacológica y antimicrobiana de los componentes químicos de las plantas medicinales utilizadas en estomatología. Revista 16 de abril. 2015; 54(257): 71-83. ISSN:1729-6935. <http://www.rev16deabril.sld.cu>
37. Samuelsen, AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. Journal of Ethnopharmacology. 2000. 71. 1–21. PII: S0378-8741(00)00212-9. www.elsevier.com/locate/jethpharm

38. Cabral E L. Ateridias- Diversidad vegetal biotaxonomía de los Spermatofitos. Universidad Nacional del Nordeste - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de Corrientes Argentina. 2010. P. 93-99.
39. Muhammad Bahrain Adoma, Muhammad Tahera, et all. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017. 96. 348-360. www.elsevier.com/locate/biopha.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.152>
40. Giovanni Garro M, Alvarenga S. Optimización de un protocolo para el cultivo *in vitro* y la micropropagación masiva del llantén (*Plantago major*). Tecnología en Marcha. 2009. Vol. 22 (3), pp.25-33.
https://www.researchgate.net/publication/279470165_Optimizaion_de_un_protocolo_para_el_cultivo_in_vitro_y_la_micropropagacion_masiva_del_llanten_Plantago_major
41. Stevens, PF. Angiosperm Phylogeny Website. 2008. Version 9. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. [visitado diciembre 2021]
42. Izco J, Barreno E, Brugués M, et al. Botánica. McGraw-Hill Interamericana. 1998. 781 pp
43. Heywood VH. Las Plantas con flores. Editorial Reverté. 1985. 329 pp. <http://web.minambiente.gov.co/biogeo/menu/biodiversidad/regiones/orinoquia/vegetaorinoquia.htm>
44. Zuloaga FO, Morrone O. Belgrano MJ. Catálogo de las plantas vasculares del cono sur: 2008. <http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp>.
45. Hill, A. F. Botánica Económica, plantas útiles y productos vegetales. Ed. Omega. 1965.1-616 pp

46. Martínez Crovetto, R. Plantas utilizadas en medicina en el NO de Corrientes. Fundación Miguel Lillo. Micelánea. 1981. Vol. 69. 1-135 pp.
47. INCUPO. Plantas Medicinales del Nordeste Argentino. Sabiduría popular y validación científica. 1998. 1-161 pp
48. Carpio Plaza DP, Ramón Mora LE. Evaluación del efecto antiinflamatorio de las sustancias contenidas en las hojas de llantén (*Plantago major* L) a través de la técnica de inducción de granuloma por algodón. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas Escuela de bioquímica y farmacia. [Tesis de Grado]. Cuenca – Ecuador. 2009.
49. Yambay Calderon PF. Elaboración y control de calidad de una crema a base de los extractos hidroalcohólicos de berro (*Nasturtium officinale*) y llantén (*Plantago major*) y comprobación de su actividad cicatrizante en heridas inducidas en ratones. escuela superior politécnica de Chimborazo facultad de ciencias escuela de bioquímica y farmacia. [Tesis]. Riobamba, Ecuador. 2013.
50. de Souza Mesquita L M, Delevati Colpo K, Quintino da Rocha C, et al. Anatomical differentiation and metabolomic profiling: a tool in the diagnostic characterization of some medicinal *Plantago* species. Botanical Society of Sao Paulo 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s40415-017-0388-x>
51. Davini E, Iavarone C, Trogolo C, et al. The quantitative isolation and antimicrobial activity of the aglycone of aucubin. *Phytochemistry*. 1986. Vol. 25 (10) PP.2420-2422. Pergamon Journals Ltd. 0031-94/86. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81711-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81711-2)
52. Hefler SM, Rodrigues WA, Cervi AC. O gênero *Plantago* L. (Plantaginaceae) na região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*. 2011. v. 9, (3) p.

297-321. ISSN 1980-4849 / 1679-2343.

<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1696>

53. Calixto Cotos MR. Plantas medicinales utilizadas en odontología (parte 1).
Revista Kiru 2006. 3(2).
<http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2006rv2/Kiru7.pdf>
54. Sabag Asfura VA, Pinto Dávalos J, et al. Formulación de un fitomedicamento con actividad gastroprotectora a partir de extractos de llantén (*Plantago major*) BIOFARBO. 2010. 18(2).
55. Soler B. *Plantago major* (Llantén). Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacias Escuela de Postgrado Maestría Multidisciplinaria en Uso y Producción de Plantas Medicinales Farmacognosia. Tesis de grado. Guatemala. 2014
56. Teles DG, Costa MM. Estudo da ação antimicrobiana conjunta de extratos aquosos de Tansagem (*Plantago major* L., Plantaginaceae) e Romã (*Punica granatum* L., Punicaceae) e interferência dos mesmos na ação da amoxicilina *in vitro*. Rev. Bras. Pl. Med. 2014. v.16 (2), supl. I, p.323-328.
https://doi.org/10.1590/1983-084X/11_123
57. Pankoke H, Buschmann T, Müller C. Role of plant b-glucosidases in the dual defense system of iridoid glycosides and their hydrolyzing enzymes in *Plantago lanceolata* and *Plantago major*. Phytochemistry. Elsevier. 2013. 94. Pp 99–107.
www.elsevier.com/locate/phytoc
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.016>
58. Verde-Star M.J., García-González S., Rivas-Morales C. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. Investigación en plantas de importancia médica. OmniaScience. 2016. Pag 1-40. <https://doi.org/10.3926/oms.313>

59. Sarker, SD, Latif Z, Gray AI. (2005). Natural products isolation. Humana Press.
<https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-955-9:1>
60. Valencia Ortiz, C. (1995). Fundamentos de fitoquímica. México DF.: Trillas.
61. Sampietro A., Isla M, Quiroga E, Vatuone MA. Importancia del estudio fitoquímico en la formación del profesional farmacéutico. Acta Farm. (1997). Bonaerense 16 (4): 245-9 ISSN 0326-23
62. Dias DA, Urban S, Roessner U. A Historical overview of natural products in drug Discovery. Metabolites. (2012). <https://doi.org/10.3390%2Fmetabo2020303>
63. DerMarderosian A, Beutler, J.A. The review of natural products: the most complete source of natural product information. Facts and Comparisons. 2002
64. Bonatti A. Formulation of plant extracts into dosage form. R. O. B. Wijesekera. The Medicinal Plant Industry. 1991. (pp. 106-107).
65. Walton NJ, Brown DE. Chemicals from Plants: Perspectives on plant secondary products. Imperial College Press. 1999. <https://doi.org/10.1142/3203>
66. López R, Alvarez M, López T, González J. Actividad antifúngica *in vitro* de *Pinus caribaea*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1997. 2:25-29.
67. Bernal RM, Guzman U. El Antibiograma De Discos. Técnica De Kirby-Bauer Maye. Biomédica. 1984. Vol. 4 (3 y 4)
68. López Fernández RM, Téllez Rodríguez J, Rodríguez Ramírez AF. Las infecciones odontogénicas y sus etapas clínicas. Acta Pediatr Mex. 2016 sep;37(5). 302-305. www.actapediatrica.org.mx
69. Bascones Martínez A, Aguirre Urizar JM, Bermejo Fenoll A, et al. Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. Avances en Odontoestomatología. 2005. Vol. 21 (6). pp. 311-319.

70. Olarte Alzamora AA. Microbiología Endodóntica. Universidad de Magdalena. Revista de la Facultad de Ciencias de Salud. 2004. N° 1
71. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. -2ª ed.- Buenos Aires: Médica Panamericana. 2009. ISBN 978-959-06-1584-6
72. Cruz Quintana SM, Díaz Sjostrom P, Arias Socarrás D, Mazón Baldeón GM. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev. cubana Estomatol. 2017. 54(1). <http://scielo.sld.cu>
73. Costa dos Santos Júnior JC, dos Santos Santa Izabel T. Microbiota oral e sua implicação no binômio saúde-doença. Rev Contexto & Saúde Editora Unijuí Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde. 2019. vol. 19 (36). p. 91-99. ISSN 2176-7114. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2019.36.91-99>
74. Yasig Lucero JA. Efecto antimicrobiano de *Plantago major* (llantén) frente a las cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Estudio *in vitro*. [Tesis], Quito: UCE. 2021. Disponible: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/24869>
75. Karima S, Farida S, Mihoub Z M. Antioxidant and antimicrobial activities of *Plantago Major*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015. Vol 7 (5). ISSN- 0975-1491
76. Pachamango Leiva V I. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *Plantago major* (LLANTÉN) Y DEL PerioAid® 0.12% SOBRE *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. [Tesis]. Trujillo – Perú. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Estomatología. 2016
77. Crisanto Ahuite A, Reaño Rojas C D. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Plantago major* (Llantén) frente A *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, por el método de difusión

- en disco y macrodilución. [Tesis]. Iquitos - Perú. Universidad Nacional De La Amazonía Peruana Facultad De Farmacia Y Bioquímica. 2016
78. Taskovaa R, Handjieva N, Evstatieva L. Iridoid glucosides from *Plantago cornuti*, *Plantago major* and *Veronica cimbalaria*. *Phytochemistry*. 1999. 52. 1443-1445. Elsevier Science Ltd. PII: S 0 0 3 1 - 9 4 2 2 (9 9) 0 0 1 8 2 -X
79. Coronado Pérez GI, Cauna Flores PY. Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de *Plantago major* (llantén) Y *Rumex crispus* (lengua de vaca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis. Puno –Perú. Universidad Nacional Del Altiplano Facultad De Ciencias Biológicas Escuela Profesional De Biología. 2018
80. Vázquez Núñez JC. Eficacia inhibitoria entre el extracto metanólico de *Plantago major* (llantén) y clindamicina en colonias de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *in vitro*. Tesis. Cajamarca – Perú. Facultad De Ciencias De La Salud “Dr. Wilman Ruiz Vigo” Carrera Profesional De Estomatología. 2018
81. Fiestas JI, Huanca Huamani F. Extracto hidroalcohólico de *Plantago major* I y su efecto antibacteriano sobre cultivos de *Streptococcus pyogenes* estudios *in vitro*. [Tesis]. Lima – Perú. Facultad De Ciencias Farmacéuticas Y Bioquímica. 2018
82. Koohsari H, Ghaemi EA, Sadegh Sheshpoli M, et al. The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. *J Med Life*. 2015; 8(Spec Iss 2): 38–42.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5327717/>

83. Tituaña Pulluquitin GI, et al. Estudio del proceso de obtención de extractos de plantas medicinales. Revista Caribeña de Ciencias Sociales. 2018. En línea: [//www.eumed.net/rev/caribe/2018/05/extractos-plantas-medicinales.html](http://www.eumed.net/rev/caribe/2018/05/extractos-plantas-medicinales.html)
84. Cercenado E, Saavedra-Lozano J. El antibiograma. Interpretación del antibiograma, conceptos generales. Anales Pediatría Continuada. 2009. Vol. 7 (4). 214-7 - [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)
85. Rojas E, Morales C, Juárez E & Pineda N. tratamiento de la leishmaniasis cutánea con plantas medicinales en Trujillo, Venezuela. Revista Academia. 2005. Vol.4(7). <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/academia/article/view/5967>
86. Ruffa M.J., Ferraro G., Wagner M.L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. Journal of Ethnopharmacology. 2002. Vol 79. 335–339. www.elsevier.com/locate/jethpharm
87. Basma Monjd Abd Razik, Hiba Ali Hasan, Muna Khalil Murtadh. The Study of antibacterial activity of *Plantago major* and *Ceratonia siliqua*. THE IRAQI Postgraduate Medical Journal. 2012. Vol.11 (1). <https://www.iasj.net/iasj/download/789c6fdcb14ab1aa>
88. Tobar F. Acceso a Medicamentos en Argentina: diagnóstico y alternativa. Boletín Fármacos [Revista en línea] 2002 [acceso 15 de septiembre de 2021]; 5(4). Disponible en: <http://www.saludyfarmacos.org/wp-content/files//sept2002.pdf>
89. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, González L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

90. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* (2000). Vol. 31, 247– 256.
91. Nilson S, Gendron F, Et Al. Preliminary scientific investigation of the effectiveness of the medicinal plants *Plantago major* and *Achillea millefolium* against the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in partnership with indigenous elders. *Global J Res. Med. Plants & Indigen. Med.* 2014. 3(11): 402–15. ISSN 2277-4289
92. Safari Sepideh y Zare Mahmoodabadi, Reza y Arefnezhad, Mohsen y Hamedi, Shokouhsadat y Mehrabkhani, M. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de hojas de *Plantago major* con y sin nanopartículas de óxido de zinc sobre *Streptococcus mutans*: un estudio *in vitro*. *Revista de la Escuela de Odontología de Mashhad.* 2021. 45 (1). págs. 54-62. https://jmds.mums.ac.ir/article_17454.html
93. Zoran Tambur, et al. Inhibitory effects of different medicinal plants on the growth of some oral microbiome members. *Med. Weter.* 2020. 76 (8). 476-479. <https://www.researchgate.net/publication/341607779>.
<http://dx.doi.org/10.21521/mw.6433>



ANEXO





INSTITUTO DE BOTANICA DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Agrarias
Sargento Cabral 2131 – C.C. 209
3400 - Corrientes - República Argentina
Tel.: 0379-4422006/4427589 - Fax: 0379-4427131
ibone@agr.unne.edu.ar - <http://ibone.unne.edu.ar>



Identificación taxonómica de los ejemplares botánicos consultado por Lelia Inés
Ramírez

Se deja constancia que los materiales vegetales entregados, se identifican bajo el
nombre científico de:

- *Plantago tomentosa* Lam.

Se confeccionaron los ejemplares testigos para ser incorporados a la colección general
del Herbario “Carmen L. Cristóbal” (CTES).

Ramírez, L.I. 01 (CTES 07-2018)

Ramírez, L.I. 02 (CTES 07-2019)

Ramírez, L.I. 03 (CTES 10-2019)

Corrientes, 21 de junio de 2022

Lic. Walter Adrián Medina
Asistente curatorial
Herbario “Carmen L. Cristóbal” (CTES)